

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 39/385	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/37222 (43) Date de publication internationale: 28 novembre 1996 (28.11.96)
---	-----------	---

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00791

(22) Date de dépôt international: 24 mai 1996 (24.05.96)

(30) Données relatives à la priorité:
95/06417 24 mai 1995 (24.05.95) FR(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR
MERIEUX SERUMS ET VACCINS S.A. [FR/FR]; 58,
avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ARMINJON, François
[FR/FR]; 17, boulevard de la Croix-Rousse, F-69004 Lyon
(FR). CARTIER, Jean-René [FR/FR]; 55, rue Joliot-Curie,
F-69005 Lyon (FR).(74) Mandataire: KERNEIS, Danièle; Pasteur Merieux Sérums et
Vaccins, Direction de la Propriété Industrielle, 58, avenue
Leclerc, F-69007 Lyon (FR).(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA,
CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP,
KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet
ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasiatique (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT,
BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si de telles modifications sont
requises.*

(54) Title: VACCINE COMPOSITION CONTAINING POLYRIBOSYL-RIBITOL PHOSPHATE AND METHOD FOR MAKING SAME

(54) Titre: COMPOSITION VACCINALE COMPRENANT DU POLYRIBOSYL-RIBITOL PHOSPHATE ET SON PROCÉDE DE
FABRICATION

(57) Abstract

A vaccine composition containing one or more antigens comprising the high molecular weight capsular polysaccharide of type b Haemophilus influenza, or polyribosylribitol phosphate, coupled to the tetanus toxoid and an aluminium-based adjuvant, wherein the aluminium-based adjuvant has, in its natural state, or following anion addition, a zero point of charge of less than about 7.2. A method for making said vaccine composition is also described.

(57) Abrégé

L'invention concerne une composition vaccinale comprenant au moins un antigène constitué par le polysaccharide capsulaire de Haemophilus influenzae type b ou Polyribosylribitol Phosphate à haut poids moléculaire couplé à l'anatoxine tétanique ainsi qu'un adjuvant à base d'aluminium, dans lequel l'adjuvant à base d'aluminium présente par nature ou après addition d'anions un point de charge zéro inférieur à environ 7,2. L'invention a également pour objet un procédé de fabrication d'une telle composition vaccinale.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

COMPOSITION VACCINALE COMPRENANT DU POLYRIBOSYLTRIBITOL PHOSPHATE ET SON PROCEDE DE FABRICATION

L'invention concerne le domaine des compositions vaccinales et plus
5 particulièrement les compositions vaccinales comprenant au moins un antigène
constitué par le polysaccharide capsulaire de *Haemophilus influenzae* type b ou
polyribosyltritol phosphate à haut poids moléculaire couplé à l'anatoxine tétanique.

On connaît dans l'art antérieur, et notamment par l'article "Quantitative and
10 Qualitative Analyses of Serum Antibodies Elicited in Adults by *Haemophilus*
influenzae Type b and *Pneumococcus* Type 6A Capsular Polysaccharide Tetanus
Toxoid Conjugates" Rachel Schneerson et al, *Infect. Immun.* May 1986, un antigène
que l'on peut utiliser à des fins vaccinales chez l'homme afin de le protéger des
infections provoquées par *Haemophilus influenzae* type b. Cet antigène est constitué
15 par un polysaccharide capsulaire de la bactérie, le polyribosyltritol phosphate (ou
PRP) qui est rendu T-dépendant grâce à un couplage à une protéine porteuse,
l'anatoxine tétanique. Des essais réalisés chez des enfants rhésus ont montré, ainsi que
le rapporte cet article, que la réponse immunitaire était à la fois plus importante et plus
précoce, si l'antigène était associé à de l'hydroxyde d'aluminium. Cependant, ainsi que
20 le mentionne un autre article intitulé "Clinical and Immunologic responses to the
capsular polysaccharide of *Haemophilus influenzae* type b alone or conjugated to
tetanus toxoid in 18-23 month-old children", Bo A. Claesson and al, *The Journal of*
Pediatrics, May 1988, on a pu remarqué que cet antigène, adsorbé sur hydroxyde
d'aluminium était, après stockage moins immunogène que l'antigène maintenu en
25 solution saline, ce qui peut être dû à une dégradation du polysaccharide.

Afin de résoudre ce problème de stabilité des PRP-T, il a été proposé dans
l'art antérieur de le lyophiliser. Cette solution, si elle permet bien à l'antigène de
conserver son caractère immunogène au cours du temps, présente cependant des
30 inconvénients, notamment au niveau de la fabrication ; la lyophilisation et les
opérations particulières de conditionnement qu'elle requiert compliquent le procédé de
fabrication, ce qui en augmente le coût. En outre, au moment de l'administration, il est
nécessaire d'effectuer une reprise du lyophilisat, ce qui signifie qu'il est nécessaire de
disposer en plus du lyophilisat d'un liquide de reprise de ce lyophilisat ; cette opération
35 représente une contrainte supplémentaire pour le praticien et comporte, comme toute
manipulation, le risque d'être mal effectuée.

En outre, un certain nombre de combinaisons vaccinales liquides possèdent des antigènes adsorbés sur un adjuvant à base d'aluminium et il serait avantageux de pouvoir, sans perte d'immunogénicité, leur ajouter l'antigène constitué par le PRP-T. En effet, la solution proposée par l'art antérieur et consistant en une seringue
5 particulière à 2 compartiments (un premier compartiment contenant le PRP-T sous forme lyophilisée et un second compartiment contenant les autres antigènes en suspension aqueuse) dont le contenu est mélangé extemporanément au moment de l'administration n'est pas satisfaisante tant au niveau des coûts de fabrication qu'au
niveau des opérations à effectuer par le praticien.

10 Il est donc souhaitable de pouvoir disposer de composition vaccinale liquide comprenant l'antigène constitué par le PRP-T ayant un très bon caractère immunogène conservé au cours du temps, et dont les conditions de fabrication permettent la production au moindre coût.

15 Pour atteindre ces buts, l'invention a pour objet une composition vaccinale comprenant au moins un antigène constitué par le polysaccharide capsulaire de *Haemophilus influenzae* type b ou Polyribosylribitol Phosphate à haut poids moléculaire couplé à l'anatoxine tétanique ainsi qu'un adjuvant à base d'aluminium,
20 caractérisée en ce que l'adjuvant à base d'aluminium présente un point de charge zéro inférieur à environ 7,2.

On a ainsi remarqué que, de façon surprenante, dans ces conditions, le PRP-T conservait au cours du temps en milieu liquide, son très bon caractère immunogène.

25 Selon une caractéristique particulière de l'invention l'adjuvant à base d'aluminium comprend des hydroxydes d'aluminium auxquels ont été ajoutés des anions.

30 Ainsi, il est possible d'utiliser un adjuvant parfaitement qualifié pour une utilisation vaccinale tout en conservant au PRP-T en milieu liquide une très bonne immunogénicité.

Selon une autre caractéristique de l'invention, les anions sont choisis parmi les
35 phosphates ou les citrates.

Ainsi, la composition obtenue présente toutes les garanties de sécurité nécessaires à une administration vaccinale.

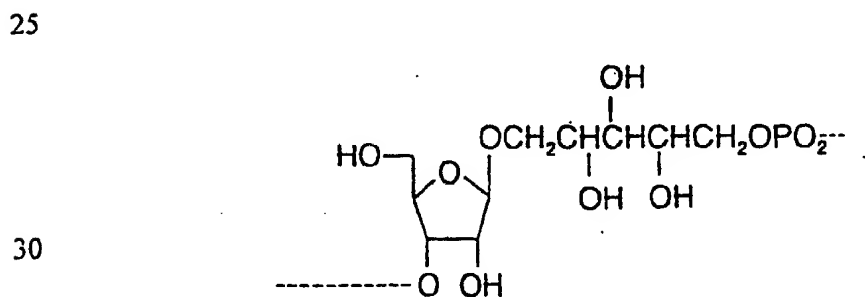
Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition vaccinale comprend en outre une ou plusieurs des valences vaccinales choisies parmi : la diphtérie, le tétanos, la coqueluche, l'hépatite B, la poliomyélite.

5 On peut ainsi disposer de combinaisons vaccinales liquides, stables, dans lesquelles chaque antigène conserve son immunogénicité, ce qui permet au praticien, sans manipulation supplémentaire de sa part, de vacciner simultanément contre plusieurs maladies ; ceci permet de réduire les coûts à la fois en ce qui concerne les produits et en ce qui concerne le nombre de visites à effectuer.

10 L'invention a également pour objet un procédé de fabrication d'une composition vaccinale comprenant au moins un antigène constitué par le polysaccharide capsulaire de *Haemophilus influenzae* type b ou Polyribosylribitol Phosphate à haut poids moléculaire couplé à l'anatoxine tétanique, caractérisé en ce
15 qu'il consiste à adjuver la composition vaccinale au moyen d'une suspension de complexes d'aluminium ayant un point de charge zéro inférieur à environ 7,2.

La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre.

20 L'antigène constitué par le polysaccharide capsulaire de *Haemophilus influenzae* type b est un polymère linéaire consistant en ribose, ribitol et acide phosphorique dont la structure monomère est la suivante :



35 Le nombre de monomères de ce type est élevé (supérieur à 100), ce qui conduit à un polysaccharide dont le poids moléculaire est de l'ordre de 500 000 à 1 000 000.

35 Le nombre de monomères de ce type est élevé (supérieur à 100), ce qui conduit à un polysaccharide dont le poids moléculaire est de l'ordre de 500 000 à 1 000 000.

Afin d'induire une réponse immunitaire des cellules T chez de jeunes enfants, cet antigène est conjugué à une protéine porteuse constituée par l'anatoxine tétanique.

Un tel antigène peut par exemple être obtenu selon la méthode décrite dans

5 "Quantitative and Qualitative analysis of serum antibodies elicited in adults by Haemophilus influenzae type b and Pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates" Schneerson et al, Infect. Immun. 52 : 519 (1986).

Les caractéristiques propres à cet antigène : nombre élevé de monomères du

10 polysaccharide, nature de la protéine porteuse, nature de la liaison entre le polysaccharide et la protéine porteuse, lui confèrent des qualités particulières et notamment une très bonne immunogénicité.

Afin de conserver ces qualités en milieu liquide au cours du temps, il a

15 maintenant été trouvé qu'on pouvait utiliser des complexes d'aluminium dont le point de charge zéro était inférieur à environ 7,2. En effet, on a trouvé que, de façon surprenante, lorsque le PRP-T est associé à de tels complexes d'aluminium, son très bon caractère immunogène est conservé au cours du temps en milieu liquide et ce, quel que soit son degré de fixation aux complexes d'aluminium.

20 Le point de charge zéro des complexes d'aluminium est l'équivalent du point isoélectrique des protéines : c'est le pH auquel la charge en surface des complexes d'aluminium est nulle. En fait, ce point de charge zéro est approché par des mesures de potentiel zeta qui peuvent être réalisées selon différentes techniques, la méthode de

25 base étant l'électrophorèse. Il est possible d'effectuer les mesures au moyen d'un appareil tel que le DELSA 440 de Coulters Electronics, Hialeah, FL, USA.

Les méthodes et appareils de mesure pouvant être différents, les résultats obtenus peuvent également varier. Les complexes d'aluminium convenant aux fins de

30 l'invention sont ceux pour lesquels ce point de charge zéro est inférieur à environ 7,2, cette valeur de 7,2 ne pouvant être qu'une valeur approximative.

Les complexes d'aluminium convenant aux fins de l'invention sont ceux qui, par nature, ont un point de charge zéro inférieur à 7,2 ou ceux qui peuvent être

35 modifiés afin d'abaisser leur point de charge zéro.

Parmi les complexes d'aluminium ayant par nature un point de charge zéro inférieur à 7,2, on peut citer ceux communément appelés phosphates d'aluminium dans

le domaine des adjuvants vaccinaux, même si d'un point de vue chimique, ils possèdent d'autres sels que les phosphates d'aluminium. Il s'agit par exemple du phosphate d'aluminium ADJUFOS® fourni par la société SUPERFOS BIOSECTOR a/s.

5

Il peut s'agir également de complexes d'aluminium obtenus par réaction de carbonate de sodium en tampon PBS sur des sulfates de potassium et d'aluminium.

10 Avec de tels complexes, bien que le PRP-T soit complètement ou partiellement lié aux complexes d'aluminium, son immunogénicité est conservée au cours du temps.

Alternativement, il est possible selon l'invention d'utiliser des complexes d'aluminium qui, par nature ont un point de charge zéro supérieur à 7,2 et qui sont
15 modifiés pour abaisser ce point de charge.

Il s'agit notamment des complexes d'aluminium connus dans le domaine des adjuvants vaccinaux comme étant des hydroxydes d'aluminium, même si d'un point de vue chimique, ils ne sont pas constitués exclusivement d'hydroxyde d'aluminium. Il
20 peut notamment s'agir de l'hydroxyde d'aluminium ALHYDROGEL® fourni par la Société SUPERFOS BIOSECTOR a/s, du produit utilisé comme adjuvant dans le D.T. Coq™ commercialisé par la Société PASTEUR MERIEUX S & V ou encore du produit utilisé comme adjuvant dans le Recombivax® commercialisé par la Société
25 MERCK.

25

Selon l'invention, la modification de ces complexes d'aluminium consiste en l'ajout d'anions. Les anions ajoutés peuvent être de différentes natures, à condition qu'ils présentent toutes les garanties de sécurité nécessaires pour une utilisation à des fins vaccinales. On a remarqué que l'ajout d'ions citrates ou d'ions phosphates
30 convenait particulièrement bien aux fins de l'invention. Les ions phosphates peuvent notamment être apportés par une solution contenant du phosphate monopotassique, du phosphate disodique et du chlorure de sodium.

Il est possible également d'utiliser une combinaison de différents anions, par
35 exemple une combinaison d'ions phosphates et d'ions carbonates.

Il est possible que les anions soient ajoutés à la suspension de complexes d'aluminium préalablement à l'ajout du PRP-T, ou que les anions soient ajoutés au

PRP-T préalablement à sa mise en contact avec les complexes d'aluminium. Par commodité, on préfère mettre le PRP-T en suspension dans une solution contenant les anions choisis avant de le porter au contact de l'adjuvant.

5 La quantité d'anions ajoutés est calculée pour abaisser le point de charge zéro des complexes d'aluminium utilisés à une valeur inférieure à environ 7,2. Cette quantité varie donc en fonction de la nature des complexes d'aluminium utilisées ainsi que de la quantité d'anions éventuellement apportés par les substances tampon utilisées. Sa détermination est à la portée de l'homme de l'art.

10 Ainsi, on obtient une composition vaccinale stable à l'état liquide, c'est-à-dire dans laquelle le PRP-T conserve son bon caractère immunogène.

15 On a en outre remarqué que, grâce à l'ajout d'anions, la fixation du PRP-T aux complexes d'aluminium était réduite, ce qui doit contribuer au maintien de son intégrité et donc de son immunogénicité.

20 Bien que cela ne soit pas préférentiel au sens de l'invention, il est possible également d'ajouter des anions aux complexes d'aluminium ayant par nature un point de charge zéro déjà inférieur à environ 7,2. Dans ce cas, on a remarqué que le point de charge zéro peut être abaissé, et que la fixation du PRP-T aux complexes d'aluminium est également réduite.

25 Par fixation, on entend toute forme de liaison rendant le PRP-T inaccessible au dosage lorsque, après centrifugation, on recueille le surnageant.

30 Les compositions vaccinales selon l'invention comprennent l'antigène vaccinal constitué par le PRP-T mais peuvent comprendre également d'autres antigènes vaccinaux et notamment ceux destinés à protéger contre la diphtérie, le tétanos, la coqueluche (cellulaire ou acellulaire), la poliomyélite, l'hépatite A, l'hépatite B...etc. En fait, tout antigène vaccinal compatible avec le PRP-T et les complexes d'aluminium est susceptible d'entrer dans la composition vaccinale selon l'invention. On peut ainsi disposer de combinaisons vaccinales liquides permettant, en une seule administration, de vacciner contre plusieurs maladies. Les compositions vaccinales
35 selon l'invention sont particulièrement adaptées à l'administration à de jeunes enfants.

 De plus, on a remarqué que l'utilisation d'une telle composition vaccinale liquide permettait lors de la vaccination de rappel effectuée chez des nourrissons de

12 mois ayant reçu des injections à 2, 4 et 6 mois, d'accroître la production d'anticorps anti PRP-T de façon particulièrement accrue par rapport à un rappel effectué dans les mêmes conditions avec le vaccin TETRAct-HIB™ commercialisé par la Société PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins.

5

Exemple 1

On fabrique une composition vaccinale à partir des éléments suivants :

10	• anatoxine tétanique purifiée (ATP)	1 unité vaccinante
	• anatoxine diphtérique purifiée (ADP)	1 unité vaccinante
	• mélange cellulaire Pertussis	15 OU (unités opacimétriques)
	• PRP-T (exprimé en poids de PRP)	12 µg
	• merthiolate	43,75 µg
15	• hydroxyde d'aluminium (exprimé en Al)	0,3 mg
	tel que celui présent dans le D.T. Coq™	
	• phosphates	30 µmoles
	• tampon tris 10 mmolaire comprenant du	0,125 ml
	saccharose à 8,5 %	
20	• eau p.p.i. qsp	0,5 ml

Les ions phosphates sont apportés à partir d'une solution contenant du phosphate monopotassique, du phosphate disodique et du chlorure de sodium.

25 Exemple 2

On a testé chez de jeunes enfants l'immunogénicité de la composition vaccinale obtenue selon l'exemple 1, comparativement à l'immunogénicité d'un vaccin de l'art antérieur, constitué par le vaccin commercialisé sous la marque TETRAct-HIB™ et
 30 qui possède les mêmes valences vaccinales mais où la valence PRP-T conservée lyophilisée est reconstituée juste avant l'injection par la composition vaccinale contenant les anatoxines diphtériques, tétaniques ainsi que le mélange cellulaire Pertussis.

35 Ce test a été réalisé sur un groupe de 262 nourrissons, dont 130 ont reçu la formulation selon l'exemple 1 et 132 ont reçu le vaccin commercial TETRAct-HIB™. L'administration des vaccins a été effectuée à 2, 6 et 12 mois en intra-musculaire.

Avant immunisation, le titre GMT en anticorps anti-PRP était de 0,2 µg/ml dans les 2 groupes ; il était de 1,9 et 1,4 µg après la seconde injection et de 5,9 et 5,8 après la 3ème injection respectivement pour le vaccin selon l'invention et le vaccin de l'art antérieur.

- 5 Après la seconde injection, 98% (avec le vaccin selon l'invention) et 93 % (avec le vaccin selon l'art antérieur) des nourrissons avaient un taux d'anticorps anti-PRP supérieur à 0,15 µg/ml ; ce taux était atteint après la 3ème injection chez 100 % des nourrissons ayant reçu le vaccin selon l'invention et chez 99 % des nourrissons ayant reçu le vaccin selon l'art antérieur.

10

Après la 3ème injection, les quantités d'anticorps dirigés contre chacune des valences vaccinales étaient en moyenne les suivantes :

	Vaccin art antérieur	Vaccin invention
Diphtérie UI/ml	1,35	1,56
Tétanos UI/ml	5,1	4,9
Titre Agglutin. Pertussis GMT	597	601
PRP µg/ml	5,8	5,9

15

Après l'injection de rappel effectuée à 12 mois, les quantités d'anticorps étaient cette fois :

	Vaccin art antérieur	Vaccin invention
Diphtérie UI/ml	3,2	4,5
Tétanos UI/ml	12,0	11,5
Titre Agglutin. Pertussis GMT	2447	2560
PRP µg/ml	19,4	32,6

20

Ces résultats montrent que la combinaison vaccinale obtenue selon l'invention est stable ; en effet l'injection de rappel effectuée sur des enfants de 12 mois, a été réalisée avec un vaccin ayant été fabriqué 18 mois auparavant : or les

résultats montrent que l'immunogénicité de chacun des antigènes de la combinaison est conservée. En outre, on obtient, de façon surprenante, un effet rappel nettement supérieur avec la composition vaccinale selon l'invention, par rapport à l'effet rappel obtenu avec un vaccin de l'art antérieur possédant les mêmes valences vaccinales.

5

Exemple 3

Des doses de composition vaccinale telle que décrite à l'exemple 1 sont maintenues à + 4°C pendant 18 à 24 mois puis sont utilisées dans un essai clinique incluant 104

10 enfants.

Les titres obtenus pour chacune des valences vaccinales sont récapitulés dans le tableau ci-après.

	Avant vaccination	Après vaccination
Diphtérie G.M.T.	0,013	0,736
Tétanos G.M.T.	0,181	3,831
PRP G.M.T. µg/ml	0,22	6,40

15

On peut ainsi voir que, même après un stockage de longue durée à +4°C, la composition vaccinale selon l'invention conserve son caractère immunogène, tant en ce qui concerne le PRP-T que les autres antigènes vaccinaux.

20 Exemple 4

On prépare des compositions vaccinales comprenant chacune du PRP-T en une concentration de 20 µg de PRP/ml, en présence de complexes d'aluminium de différentes natures, et de différents points de charge zéro (PCZ). La quantité de complexes d'aluminium est telle que la concentration en aluminium dans la composition est de 0,6 g/l.

25

Composition 1 : Complexe d'aluminium constitué par de l'hydroxyde d'aluminium tel que celui utilisé dans le vaccin D.T. CoqTM commercialisé par PMsv. PCZ = 11,3

30

Composition 2 : Complexe d'aluminium constitué par de l'hydroxyde d'aluminium tel que celui utilisé dans le vaccin Recombivax[®] commercialisé par Merck. PCZ = 7,4

Composition 3 : Complexe d'aluminium constitué par du phosphate d'aluminium obtenu par mélange de chlorure de sodium et de phosphate trisodique. PCZ = 6,2

- 5 Composition 4 : Complexe d'aluminium constitué par le produit appelé Alum et obtenu par réaction de carbonate de sodium en tampon PBS sur des sulfates de potassium et d'aluminium. PCZ = 5,4

Les compositions vaccinales sont obtenues par simple mélange des suspensions contenant les complexes d'aluminium et du PRP-T.

10

Exemple 5

On teste l'immunogénicité chez des souris des différentes compositions obtenues.

- 15 Afin de vérifier la stabilité immunogénique, on soumet les compositions obtenues à des conditions de vieillissement accéléré, i.e. qu'on les conserve 2 semaines à 37°C.

- 20 Le test d'immunogénicité est effectué sur des souris de 22-24 g à qui on administre en sous-cutané des doses de 0,5 ml contenant chacune 2,5 µg de PRP. Les administrations sont effectuées à J0 et à J14. On prélève le sang des souris à J14 et à J21 et on détermine le taux d'anticorps par dosage radio immunologique. Le nombre de souris inoculées pour chaque composition vaccinale est de 8.

Le résultat est considéré satisfaisant si :

25

- on a au moins 75 % des souris à J21 qui ont un titre $\geq 0,5$,
- on a une différence significative entre les résultats obtenus à J14 et ceux obtenus à J21.

- 30 On considère que la composition vaccinale obtenue est stable si les résultats obtenus après vieillissement accéléré sont satisfaisants.

Les résultats obtenus pour les compositions testées sont récapitulés dans le tableau ci-après :

35

	PCZ	Test immuno.
C1	11,3	Non satisfaisant
C2	7,4	Non satisfaisant
C3	6,2	Satisfaisant
C4	5,4	Satisfaisant

On voit ainsi que lorsque le point de charge zéro des complexes d'aluminium est un pH acide, la composition vaccinale obtenue est stable.

5 Exemple 6

On vérifie pour chacune des compositions de l'exemple 4, le pourcentage de PRP-T fixé aux complexes d'aluminium.

- 10 Pour cela, on centrifuge chacune des compositions ; on recueille le surnageant dans lequel on dose par ELISA ou par RIA la quantité de PRP-T non fixé.

La différence entre la concentration de PRP-T dans la composition de départ et la quantité dosée dans le surnageant permet de déterminer le pourcentage de PRP-T fixé.

- 15 Les résultats obtenus sont relatés ci-après :

- C1 : 100 %
C2 : 100 %
20 C3 : 100 %
C4 : 70 %

Exemple 7

- 25 On modifie la composition 1 en lui ajoutant des ions phosphates afin d'obtenir une concentration de 50 mMole/l. Le test d'immunogénicité réalisé chez la souris après vieillissement accéléré de la solution conduit alors à un résultat satisfaisant.

- 30 La détermination du pourcentage de fixation de PRP-T aux complexes d'aluminium montre que, dans ces conditions, seul 20 % du PRP-T est fixé.

Exemple 8

On modifie la composition 1 en lui ajoutant cette fois des ions citrates afin d'obtenir une concentration de 200 mMole/l.

5

Le test d'immunogénicité réalisé chez la souris après vieillissement accéléré de la solution conduit alors à un résultat satisfaisant.

10 La détermination du pourcentage de fixation de PRP-T aux complexes d'aluminium montre que, dans ces conditions, le PRP-T n'est plus du tout fixé.

Exemple 9

15 On modifie la composition 2 en lui ajoutant des ions phosphates afin d'obtenir une concentration de 20 mMole/l.

20 Le test d'immunogénicité réalisé chez la souris après vieillissement accéléré de la solution conduit alors à un résultat satisfaisant. La détermination du pourcentage de fixation de PRP-T aux complexes d'aluminium montre que, dans ces conditions, le PRP-T n'est plus du tout fixé.

Exemple 10

25 On modifie la composition 3 en lui ajoutant des ions phosphates en différentes quantités et on détermine le pourcentage de fixation du PRP-T aux complexes d'aluminium.

Si la quantité d'ions phosphates ajoutée est telle que la concentration en phosphates dans la composition est de 2 mMole/l, le pourcentage de PRP-T fixé est réduit à 10 %.

30

Si la quantité d'ions phosphates ajoutée est telle que la concentration en phosphates dans la composition est de 4 mMole/l, le PRP-T n'est plus du tout fixé.

35 Les tests d'immunogénicité réalisés chez la souris après vieillissement accéléré de la solution sont satisfaisants.

Exemple 11

On modifie la composition 4 en lui ajoutant des ions phosphates pour atteindre une concentration de 60 mMole/l.

5

La détermination du pourcentage de PRP-T fixé aux complexes d'aluminium montre que, dans ces conditions, seul 30 % du PRP-T est fixé. Le test d'immunogénicité réalisé chez la souris après vieillissement accéléré de la solution conduit à un résultat satisfaisant.

10

Exemple 12

On prépare une composition vaccinale à partir des éléments suivants :

15	• Hydroxyde d'Aluminium (exprimé en Al)	0,25 mg
	• PRP-T (exprimé en poids de PRP)	10 µg
	• ADP	1 dose vaccinante
	• ATP	1 dose vaccinante
	• Phosphates	15 µMoles
20	• Antigènes Polio	40 U
	type I	8 U
	type II	32 U
	type III	25 µg
	• Anatoxine Pertussis	25 µg
	• F-HA Pertussis	0,125 ml
25	• tampon tris 50 mmolaire	
	comprenant du saccharose à 42,5 %	0,5 ml
	• eau p.p.i. qsp	

30 Les tests d'immunogénicité relatifs au PRP-T réalisés chez la souris avec une solution ainsi préparée, ainsi qu'avec une solution stockée 1 mois à 37°C, une solution stockée 2 mois à 25°C, et une solution stockée 6 mois à 4°C, ont tous conduit à des résultats satisfaisants, ce qui montre la stabilité du PRP-T dans un tel environnement.

Exemple 13

35

On prépare une composition vaccinale à partir des éléments suivants :

	• Hydroxyde d'Aluminium (exprimé en Al)	0,3 mg
	• PRP-T (exprimé en poids de PRP)	10 µg
	• ADP	1 dose vaccinante
	• ATP	1 dose vaccinante
5	• Anatoxine Pertussis	25 µg
	• F-HA	25 µg
	• Protéine Hbs (telle que présente dans le vaccin GenHevac B PASTEUR®)	20 µg
	• Antigènes Polio	40 U
	type I	8 U
10	type II	32 U
	type III	20 µMoles
	• phosphates	5 µMoles
	• carbonates	0,125 ml
	• tampon tris 50 mMolaire	
15	comprenant du saccharose à 42,5 %	0,5 ml
	• eau p.p.i. qsp	

On vérifie la stabilité de la solution ainsi préparée en la soumettant 2 semaines à 37°C et en effectuant ensuite un test d'immunogénicité du PRP-T chez la souris ainsi que cela a été décrit à l'exemple 5.

Les résultats obtenus sont satisfaisants.

On réalise un test d'immunogénicité de la protéine Hbs ; ce test est réalisé chez la souris et consiste à doser les anticorps anti-Hbs par ELISA, puis à déterminer la Dose Effective 50 % qui doit, pour que le test soit considéré satisfaisant, être inférieure à 0,970 µg de protéine Hbs.

Les résultats obtenus avec la solution préparée comme indiqué ci-dessus et maintenue 2 semaines à 37°C avant d'être testée, ont été satisfaisants.

Exemple 14

On prépare une composition vaccinale à partir des éléments suivants :

35	• Hydroxyde d'Aluminium (exprimé en Al)	0,3 mg
	• PRP-T (exprimé en poids de PRP)	10 µg
	• ADP	1 dose vaccinante

		1 dose vaccinante
	• ATP	10 µg
	• Anatoxine Pertussis	5 µg
	• F-HA	5 µg
	• Fimbriae	3 µg
5	• Pertactine	20 µg
	• Protéine Hbs (telle que présente dans le vaccin GenHevac B PASTEUR®)	
	• Antigènes Polio type I	40 U
	type II	8 U
	type III	32 U
10	• phosphates	20 µMoles
	• carbonates	10 µMoles
	• MgCl ₂	5 µMoles
	• tampon tris 50 mMolaire	0,125 ml
15	comprenant du saccharose à 42,5 %	0,5 ml
	• eau p.p.i. qsp	

- Les tests d'immunogénicité relatifs au PRP-T réalisés ainsi que cela a été décrit à l'exemple 5, et ceux relatifs à la protéine Hbs réalisés ainsi que cela a été décrit à l'exemple 13, ont tous conduit à des résultats satisfaisants, montrant la stabilité de la composition vaccinale selon l'invention.

REVENDEICATIONS

1. Composition vaccinale comprenant au moins un antigène constitué par le polysaccharide capsulaire de *Haemophilus influenzae* type b ou Polyribosylribitol Phosphate à haut poids moléculaire couplé à l'anatoxine tétanique ainsi qu'un adjuvant à base d'aluminium, caractérisée en ce que l'adjuvant à base d'aluminium présente un point de charge zéro inférieur à environ 7,2.
2. Composition vaccinale selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'adjuvant à base d'aluminium comprend des hydroxydes d'aluminium auxquels ont été ajoutés des anions.
3. Composition vaccinale selon la revendication 2, caractérisée en ce que les anions sont choisis parmi les phosphates et les citrates.
4. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'adjuvant à base d'aluminium comprend des phosphates d'aluminium.
5. Composition vaccinales selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'adjuvant à base d'aluminium comprend des sulfates de potassium et d'aluminium.
6. Composition vaccinale selon une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre une ou plusieurs des valences vaccinales choisies parmi : la diphtérie, le tétanos, la coqueluche, l'hépatite B, la poliomyélite.
7. Procédé de fabrication d'une composition vaccinale comprenant au moins un antigène constitué par le polysaccharide capsulaire de *Haemophilus influenzae* type b ou polyribosylribitol phosphate couplé à l'anatoxine tétanique, caractérisé en ce qu'il consiste à adjuver la composition vaccinale au moyen d'une suspension de complexes d'aluminium ayant un point de charge zéro inférieur à environ 7,2.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il consiste à ajouter aux complexes d'aluminium des anions choisis parmi les phosphates et les citrates.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 96/00791

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K39/385

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 208 375 (SCLAVO S.P.A.) 14 January 1987 see column 2, line 8 - column 6, line 7 ---	1-8
A	EP,A,0 320 942 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 21 June 1989 ---	
A	EP,A,0 101 562 (AMERICAN CYANAMID) 29 February 1984 ---	
A	WO,A,93 24148 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 9 December 1993 -----	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 September 1996

Date of mailing of the international search report

20.09.96

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 96/00791

Information on patent family members		FCI/IR		
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP-A-208375	14-01-87	CA-A-	1272952	21-08-90
		DE-A-	3682838	23-01-92
		HK-A-	192895	29-12-95
		JP-B-	7121870	25-12-95
		JP-A-	62030726	09-02-87
		US-A-	4711779	08-12-87

EP-A-320942	21-06-89	JP-A-	1238594	22-09-89

EP-A-101562	29-02-84	AU-B-	561683	14-05-87
		AU-A-	1815783	23-02-84
		CA-A-	1209036	05-08-86
		JP-A-	59053431	28-03-84

WO-A-9324148	09-12-93	AU-A-	4315693	30-12-93
		CA-A-	2136429	09-12-93
		CN-A-	1085450	20-04-94
		CZ-A-	9402892	13-09-95
		EP-A-	0642355	15-03-95
		FI-A-	945483	20-01-95
		HU-A-	71791	28-02-96
		JP-T-	7508267	14-09-95
		NO-A-	944475	18-01-95
		SI-A-	9300271	31-12-93
		SK-A-	142194	09-08-95
		ZA-A-	9303541	21-06-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 96/00791

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K39/385

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP,A,0 208 375 (SCLAVO S.P.A.) 14 Janvier 1987 voir colonne 2, ligne 8 - colonne 6, ligne 7 ---	1-8
A	EP,A,0 320 942 (AMERICAN CYANAMID COMPANY) 21 Juin 1989 ---	
A	EP,A,0 101 562 (AMERICAN CYANAMID) 29 Février 1984 ---	
A	WO,A,93 24148 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS) 9 Décembre 1993 -----	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *G* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Septembre 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

20.09.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Rempp, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No
PCT/FR 96/00791

RAPPORT DE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR 96/00752

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-208375	14-01-87	CA-A- 1272952	21-08-90
		DE-A- 3682838	23-01-92
		HK-A- 192895	29-12-95
		JP-B- 7121870	25-12-95
		JP-A- 62030726	09-02-87
		US-A- 4711779	08-12-87

EP-A-320942	21-06-89	JP-A- 1238594	22-09-89

EP-A-101562	29-02-84	AU-B- 561683	14-05-87
		AU-A- 1815783	23-02-84
		CA-A- 1209036	05-08-86
		JP-A- 59053431	28-03-84

WO-A-9324148	09-12-93	AU-A- 4315693	30-12-93
		CA-A- 2136429	09-12-93
		CN-A- 1085450	20-04-94
		CZ-A- 9402892	13-09-95
		EP-A- 0642355	15-03-95
		FI-A- 945483	20-01-95
		HU-A- 71791	28-02-96
		JP-T- 7508267	14-09-95
		NO-A- 944475	18-01-95
		SI-A- 9300271	31-12-93
		SK-A- 142194	09-08-95
		ZA-A- 9303541	21-06-94

